

JP2859679B

1

*Caution : Translation Standard  
Is Post-Edited Machine Translation*

## Patent Claims

### Claim 1

Cell line of novel Chinese hamster ovarian cell (CHO cell) which can proliferate and can be subcultured in culture medium which does not contain serum and protein (hereinafter, abbreviated to serum-free protein-free culture medium) for two months or more.

### Claim 2

Novel CHO cells which can proliferate and can be subcultured in serum-free protein-free culture medium for two months or more, and also have glutamine non-dependency.

### Claim 3

Novel CHO cells in accordance with Claim 2, wherein the serum-free protein-free culture medium is a culture medium completely sterilised by steam cooking.

## Detailed Description of the Invention

### Sphere of Application in Industry

This invention relates to novel cell line of Chinese hamster ovarian cell (CHO cell) which can proliferate and can be subcultured in serum-free protein-free culture medium for two months or more, and novel CHO cells which can proliferate and can be subcultured in serum-free protein-free culture medium for two months or more, and also have glutamine non-dependency.

The cells obtained in this invention can be used as host cells for introducing genes encoding useful proteins.

### Technology of the prior art

The large-scale culturing of animal cells have been used for the production of virus, vaccine, moreover for the production of interferon and monoclonal antibody from leukocyte and hybridoma. Moreover, as a result of recent progress in transgenic techniques, protein can be produced as native type of the physiologically active substance that is present in vivo, therefore, the production of the useful protein using animal cells as the host have been attracting attention, and the importance of large scale culturing technique has been recognised again.

As one problem of useful substance production by large-scale culturing of animal cells, there may be nominated the fact that serum must be added to the basal medium for the growth of animal cells. Because not only is the serum expensive, but also contains various kinds of proteins, the purification of target protein is complicated. Moreover, the quality differs for every lot, and the effect on cell proliferation is also great. Therefore, a development of cells that can proliferate in serum-free medium, moreover in protein-free medium has been desired.

~~As process using serum-free medium, a process of culturing CHO cells in serum-free medium containing insulin, transferring and selenium (in vitro Cellular & Developmental Biology, Vol. 21, No. 10, p. 588, 1985), a process of culturing Hela cells in serum-free medium containing insulin, hydrocortisone, transferrin, epidermal growth factor and fibroblast growth factor (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, vol. 75, No. 2, p. 901, 1978), a process of culturing BHK cells in serum-free medium containing insulin, transferrin, fibroblast growth factor, fibronectin and oleic acid (Journal of cellular physiology, Vol. 114, p. 215, 1983) are known. Moreover, as the cells which can grow in serum-free medium, monoclonal antibody producing mouse hybridoma (Kokai 58-63385), conditioned cells of interferon producing human Burkitt tumour derived Namalwa cells (Kokai 60-6190), conditioned cells of CHO cells that grow on medium only added with insulin as protein growth factor (Kokai 63-192381) have been known.~~

Serum-free culturing of various kinds of cells have been possible by combinations of growth factors, however, some growth factors are expensive. Moreover, in terms of drug production by large-scale culturing, contamination of foreign protein even by a trace amount in the growth factor is not preferable, and the growth factor used is required to be of very high purity.

Therefore, cells that can proliferate in serum-free medium and can proliferate in protein-free medium are desired. The previously reported serum-free conditioned cells can hardly be cultured in protein-free medium, and arrest of cell proliferation or marked decrease of viable cells occur, therefore the production efficiency of the substance is poor.

As cell strain that proliferates in protein-free culture medium, there is various kinds of P3 strains conditioned by Katsuta et al. (Methods in cell Biology, Vol 6, 1973). However, in each case, the cells are not CHO cell, besides are glutamine-dependent strain.

Moreover, when these cells are to be cultured, a filter is used for the sterilization of at least one component of culture medium component, and the contamination of microbes, viruses or the like cannot be strictly ruled out. In order to prevent contamination of such microbes and viruses, steam cooking sterilisation is required as the sterilisation means, however, if proteinous component or nutrients such as glutamine or the like are contained, thermal denaturation and degradation are caused by the steam cooking sterilisation, therefore steam cooking sterilisation cannot be carried out. As the glutamine non-dependent cells, normal rat hepatocyte derived cell that proliferate in glutamine-free and protein-free culture medium (Dokkyo J. Med. Sci., Vol. 9, pp. 97-105, 1982), Namalwa cells that require insulin and transferrin as proteins, but proliferate in glutamine-free culture medium (Cytotechnology, vol. 1, pp. 151-158, 1988), that were made glutamine non-dependent in the presence of serum (Modern Approaches to Animal cell technology), K562K<sub>1</sub> cells that proliferate in complete steam cooking sterilised medium (protein-free, glutamine-free medium) (5th next-generation industry basic technology symposium Text, pp. 129-141, 1987) have been known.

However, there is no known report of substrain of CHO cells that grow on serum-free protein-free culture medium, and even grown on glutamine-free culture medium.

#### The problems to be solved by the invention

The object of this invention is to put forward novel cell line of Chinese hamster ovarian cell (CHO cell) which can proliferate and can be subcultured in serum-free protein-free culture medium for two months or more, and novel CHO cells which can proliferate and can be subcultured in serum-free protein-free culture medium for two months or more, and also have glutamine non-dependency.

#### Means to Overcome these Problems

In accordance with this invention, novel cell line of Chinese hamster ovarian cell (CHO cell) which can proliferate and can be subcultured in serum-free protein-free culture medium for two months or more, and novel CHO cells which can proliferate and can be subcultured in serum-free protein-free culture medium for two months or more, and also have glutamine non-dependency are put forward.

Below this invention will be described in greater detail.

### 1) Method of conditioning

As parent strain for conditioning, any cells that are derived from Chinese hamster ovary cell (CHO cell) that are not possible to proliferate and subculture in a serum-free medium can be used. As an ideal example, dihydrofolate reductase deficient strain CHO cell d'DXB11 strain derived from the CHO cell which is a substrain of CHO-K1 strain (ATCC CCL61) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, 4216-4220, 1980, DNA Vol. 3, 297-308, 1984) is proposed.

Essentially CHO cells are adherent cells, however, suspension culture is preferably used as the conditioning method.

In the suspension culture, the cell inoculation concentration is preferably  $0.5-8 \times 10^5$  cells/ml, and this concentration is preferably maintained during culturing. Moreover, the culture medium needs to be replaced regularly so that the pH of culture medium does not become 6.5 or less and that the nutrient source in the medium is not used up. At the time of culture medium replacement, if the cell number is markedly decreased, concentration is carried out by centrifugation or elimination of supernatant, conversely when the cell number is improved, dilution is carried out and thereby the cell number is adjusted. In particular, the initial phase at the start of conditioning may accompany marked decrease in cell number. The conditioning period requires two months or more.

The actual conditioning process is shown with example of CHO cell d'DXB11 strain.

#### 1-1). Conditioning method to serum-free medium.

CHO cell d'DXB11 strain is used as the seed cells, and the cell number at which contact inhibition more or less occurs in adherent state ( $4 \times 10^5$ /ml) is inoculated to a basal medium (40 ml) added with serum alternatives instead of serum. This is cultured at 37°C for 2-4 days. Thereafter, cells growing in suspended state are centrifuged and separated at 1500 rpm for five minutes, and are resuspended in fresh basal medium (40 ml).

By repeating such operation, the growth of conditioned strain is stabilised, and survival rate improves. This conditioning procedure is continued repeatedly for two months or more till the survival rate of the conditioned strain approaches the survival rate of the parent strain that is cultured in usual culture medium in which the parent strain can grow.

As basal medium, general culture medium used in animal cell culture can be used. For example, RPM1-1640, MEM, Dulbecco MEM, Ham F12, Ham F10, DM160, DM170 (made by Far East pharmaceutical company), 1:1 mixed culture medium of Dulbecco MEM and Ham F12, 2:1:1 mixed culture medium of RPM1-1640, Dulbecco MEM and Ham F12, or the like may be proposed.

As serum substitute, 0.1-100  $\mu\text{g/ml}$ , preferably 1-10  $\mu\text{g/ml}$  transferrin, 0.1-100  $\mu\text{g/ml}$ , preferably 1-10  $\mu\text{g/ml}$  insulin, 0.1-100  $\mu\text{g/ml}$ , preferably 1-10  $\mu\text{g/ml}$  folic acid,  $0.1-100 \times 10^{-8}$  M, preferably  $1-10 \times 10^{-8}$  M selenous acid, 0.001-10 %, preferably 0.01-1 % Pepol B-188 (made by Toho Chiba Chemicals Co.), 1  $\mu\text{g}$  - 10 mg/ml, preferably 10-100  $\mu\text{g/ml}$  dimethyl- $\alpha$  or  $\beta$ -cyclodextrin (made by Toshin Chemicals Co.) and 0.01-10 %, preferably 0.01-0.1 % polyethylene glycol 20000 are combined and used.

As further additives, 1-300 mM, preferably 5-25 mM hepes buffer, 0.5-10 mM, preferably 1-5 mM glutamine, 0.1-100  $\mu\text{M}$ , preferably 5-50  $\mu\text{M}$  ferrous sulfate, 0.1-25 ml/100ml, preferably 1-10 ml/100ml non-essential amino acid liquid mixture for MEM are combined and used.

In this way, CHO cells which can grow in serum-free medium. The obtained cells are named CHO cell KJM-1 strain.

The CHO cell KJM-1 strain has adhesion non-dependency, and can grow in suspended state in the serum-free medium.

#### 1-2). Conditioning method to serum-free protein-free medium

The serum-free conditioned CHO cell KJM-1 strain obtained previously are used as seed cells, and are inoculated at cell density of about  $4 \times 10^5$  cells/ml to a serum-free protein-free medium (40 ml) having the composition wherein the transferrin and insulin are removed from the serum-free medium used in 1-1). This is cultured at 37°C for 2-4 days. Thereafter, cells growing under suspended state are centrifuged and separated at 1500 rpm for five minutes, and are resuspended in the said fresh culture medium (40 ml).

By repeating such operation, the growth of conditioned strain is stabilised, and survival rate improves. This conditioning procedure is continued repeatedly for two months or more till

the survival rate of the conditioned strain approaches the survival rate of the parent strain that is cultured in usual culture medium in which the parent strain can grow.

As for the basal medium, the serum substitute and the other additives, the same species as the aforesaid species excluding transferrin and insulin can be used.

In this way, CHO cells which can grow for two months or more in serum-free protein-free culture medium can be obtained. The obtained cells are named CHO cell KJM-1PF strain.

**2). Impairment of glutamine non-dependency**

The obtained serum-free protein-free conditioned CHO cell KJM-1PF strain is cultured in a medium added with excess glutamic acid instead of the glutamine of the serum-free protein-free culture medium composition used in 1-2), and thereby glutamine non-dependency can be imparted to the CHO cell KJM-1PF strain.

The excess glutamic acid is about 10-30 times of glutamic acid content contained in general medium, and in particular 20 times of glutamic acid is contained in the culture medium.

In Example 3, glutamic acid of equivalent quantity to the glutamine (20 times of the glutamic acid quantity generally contained in the culture medium) was contained instead of glutamine.

In this way, the CHO cells which can grow in serum-free protein-free culture medium for two months or more and also have glutamine non-dependency can be obtained. The obtained cell is named CHO cell KJT-1 strain.

Based on Budapest treaty, the CHO cell KJT-1 strain has been deposited as FERM issue 2776 (FERM BP-2776) to National Institute of Bioscience and Human Technology on February 27, 1990.

As for the confirmation of growth of CHO cell KJT-1 strain in the complete steam cooking sterilisation culture medium and the glutamine non-dependency, there is a process of analysing the glutamine in the culture liquor by amino acid automatic analysis machine JLC-200A (made by JEOL company), as a direct method. There are cases that the glutamine which is a component not included beforehand may be detected in the culture supernatant, however, as a result of the analysis of the culture liquor obtained, the glutamine content was

not found. As an indirect demonstration process, there is a method of elucidation with growth curve of CHO cell KJT-1 strain and induction of glutamine synthase.

By these results, it is proved that the glutamine is not contained at all in the steam cooking sterilised culture medium, and that the CHO cell KJT-1 strain can grow in a culture medium that does not contain glutamine at all.

Below Examples of this invention and Reference Example are shown.

#### **Example 1**

##### Raising of serum-free medium conditioned strain.

Ham F12 was used as basal medium. The serum-free medium 40 ml added with transferrin 10 µg/ml, insulin 10 µ/ml, folic acid 10 µ/ml, selenous acid  $1.25 \times 10^{-8}$  M, Pepol B-188 0.1 %, Hepes buffer 7.5 mM, glutamine 2 mM, ferrous sulfate 10 µM, nonessential amino acid liquid mixture for MEM 10 ml/100 ml and sodium bicarbonate 0.15 % (hereinafter, abbreviated to culture medium a) was introduced to culture flask of 75 cm<sup>2</sup>, and CHO cells of DXB11 strain (serum dependent) were inoculated at cell density of  $4 \times 10^5$ /ml to this.

Static culture was carried out for three days at 37°C, and next the cells which grew in suspended state were centrifuged at 1500 rpm for five minutes, and it was recovered, and resuspended in fresh serum-free medium 40 ml formed from the same as above composition.

The survival rate decreased as the passage progressed. The survival rate decreased to 7 % by the 7th day from the start of culturing, however, the survival rate improved by repeating the successive subculturing. The survival rate recovered to 80 % or more by 2 months after the start of the culturing, and the cells were able to proliferate to the cell number of around  $1 \times 10^6$  cells/ml. Since then stable proliferation has been seen for 17 months or more from the start of culturing.

In this way, the CHO cell KJM-1 strain which was serum-free medium conditioned strain was obtained.

#### **Example 2**

##### Raising of serum-free protein-free culture medium conditioned strain.

Ham F12 was used as basal medium, and the serum-free protein-free medium 40 ml added with selenous acid  $1.25 \times 10^{-8}$  M, Pepol B-188 0.1 %, Hepes buffer 7.5 mM, glutamine 2 mM, ferrous sulfate 10  $\mu$ M, nonessential amino acid liquid mixture for MEM 10 ml /100 ml and sodium bicarbonate 0.15 % (hereinafter, abbreviated to culture medium b) was introduced to culture flask of 75 cm<sup>2</sup>, and CHO cell KJM-1 strain was inoculated at cell density of  $4 \times 10^5$  cells/ml to this. Static culture was carried out for three days at 37°C, and next cell growing in suspended state were centrifuged at 1500 rpm for five minutes, recovered, and resuspended in fresh serum-free protein-free culture medium 40 ml formed from the same as above composition.

The survival rate decreased as the passage progressed. The survival rate decreased to 20 % by the 7th day from the start of culturing, however, the survival rate improved by repeating the successive subculturing. The survival rate recovered to 80 % or more by 2 months after the start of the culturing, and the cells were able to proliferate to the cell number of around  $1 \times 10^6$  cells/ml.

In this way, CHO cell KJM-1PF strain which was serum-free protein-free culture medium conditioned strain was obtained.

### Example 3

#### Impairment of glutamine no-dependency.

In culture medium (40 ml) added with glutamic acid 4 mM instead of glutamine 2 mM of the serum-free protein-free culture medium composition used in Example 2, the CHO cell KJM-1PF strain obtained in Example 2 was inoculated, and the cells were cultured at 37°C for three days.

In this way, CHO cell KJT-1 strain which can multiplied and subcultured for two months or more in serum-free protein-free culture medium and also has glutamine non-dependency was obtained.

### Reference Example 1

#### Confirmation of impairment of glutamine non-dependency

Ham F12 was used as basal medium, and a medium wherein a serum-free protein-free culture medium 40 ml added with selenous acid  $1.25 \times 10^{-8}$  M, Pepol B-188 0.1 %, Hepes buffer 7.5 mM, ferrous sulfate 10  $\mu$ M, glutamic acid 4 mM, nonessential amino acid liquid mixture for

MEM 10 ml /100 ml was steam cooking sterilised, and furthermore separately steam cooking sterilised sodium bicarbonate was added to comprise 0.15 % at the time of use (hereinafter abbreviated to culture medium c) was used, and CHO cell KJT-1 strain was cultured at 37°C.

The results thereof are shown in Figure 3.

## Reference Example 2

### Comparison of glutamine synthase activity in cells

CHO cell d'DXB11 strain and CHO cell KJT-1 strain were respectively cultured at 37°C in culture medium c for four days.

CHO cell d'DXB11 strain and CHO cell KJM-1PF strain were respectively cultured at 37°C in filtration sterilised culture medium b for four days.

After culturing, glutamine synthase activity in each cell was compared. The results are shown in Table 1.

Table 1

<u>Test cell strain</u>	<u>(medium used)</u>	<u>Activity (<math>\mu\text{mole}/10^6 \text{ cells/day}</math>)</u>
CHO cell d'DXB11 strain	(medium b)	0.054
CHO cell d'DXB11 strain	(medium c)	0.188
CHO cell KJM-1PF strain	(medium b)	0.062
CHO cell KJM-1PF strain	(medium c)	0.080

### Advantages Afforded by this Invention

In accordance with this invention, novel cell line of Chinese hamster ovarian cell (CHO cell) which can proliferate and can be subcultured in serum-free protein-free culture medium for two months or more, and novel CHO cells which can proliferate and can be subcultured in serum-free protein-free culture medium for two months or more, and also have glutamine non-dependency can be put forward.

### Brief Description of the Figures

Figure 1 shows a growth curve of CHO cell KJM-1 strain cultured in medium a at 37°C, and a growth curve of CHO cell d'DXB11 strain cultured in medium in which 5 % bovine foetal

serum was added instead of transferrin and insulin in the culture medium a composition at 37°C. in the Figure, open circle solid line is the growth curve of CHO cell KJM-1 strain, and the solid circle solid line is the growth curve of CHO cell d'DXB11 strain.

Figure 2 shows a growth curve of CHO cell KJM-1PF strain cultured in culture medium b at 37°C.

Figure 3 shows a growth curve of CHO cell KJT-1 strain cultured in culture medium c at 37°C.

In all Figures, the vertical axis is viable cell count ( $1 \times 10^5$  cells/ml), the horizontal axis is the number of days cultured.

**Figure 1**

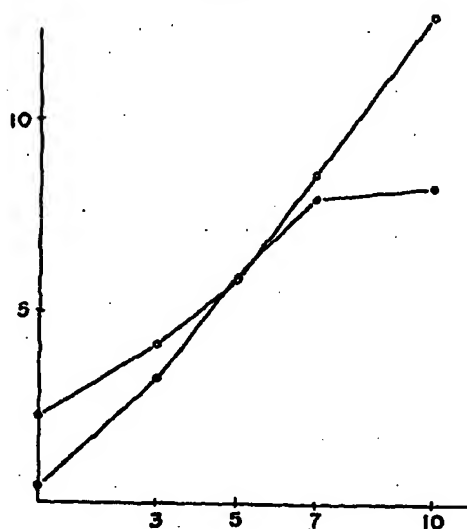


Figure 2

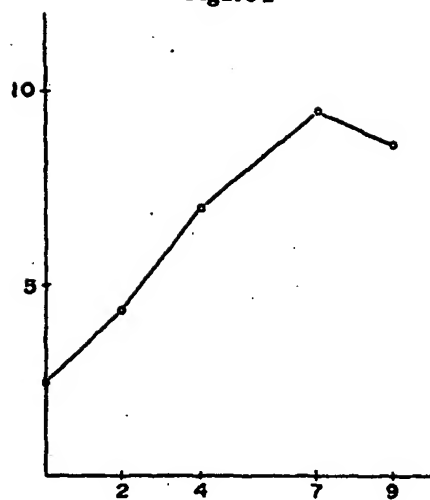
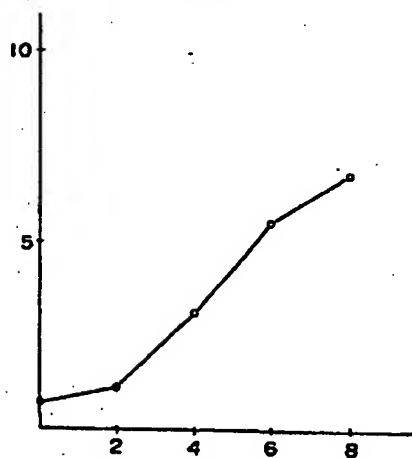


Figure 3



**Rising Sun Communications Ltd. Terms and Conditions (Abbreviated)**

Rising Sun Communications Ltd. shall not in any circumstances be liable or responsible for the accuracy or completeness of any translation unless such an undertaking has been given and authorised by Rising Sun Communications Ltd. in writing beforehand. More particularly, Rising Sun Communications Ltd. shall not in any circumstances be liable for any direct, indirect, consequential or financial loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation or consultation services by the customer.

Rising Sun Communications Ltd. retains the copyright to all of its' translation products unless expressly agreed in writing to the contrary. The original buyer is permitted to reproduce copies of a translation for their own corporate use at the site of purchase, however publication in written or electronic format for resale or other dissemination to a wider audience is strictly forbidden unless by prior written agreement.

The Full Terms and Conditions of Business of Rising Sun Communications may be found at the web site address <[http://www.risingsun.co.uk/Terms\\_of\\_business.html](http://www.risingsun.co.uk/Terms_of_business.html)>

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2859679号

(45) 発行日 平成11年(1999) 2月17日

(24) 登録日 平成10年(1998) 12月4日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	P I	
C 1 2 N 5/08		C 1 2 N 5/00	E
5/10			B
// C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A
(C 1 2 N 5/06			
C 1 2 R 1:91)			

請求項の数 3 (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平2-50076  
(22) 出願日 平成2年(1990) 3月1日  
(65) 公開番号 特開平3-254679  
(43) 公開日 平成3年(1991) 11月13日  
審査請求日 平成9年(1997) 1月17日  
微生物の受託番号 FERM BP-2776

(73) 特許権者 999999999  
旭和醸造工業株式会社  
東京都千代田区大手町1丁目6番1号  
(72) 発明者 細井 伸二  
東京都町田市成瀬2-21-2  
(72) 発明者 佐藤 征二  
神奈川県厚木市森の里2-6-3

審査官 内田 俊生

(58) 調査した分野(Int.Cl.<sup>8</sup>, DB名)  
C12N 5/08  
C12N 5/10  
WPI (DIALOG)  
BIOSIS (DIALOG)

(54) 【発明の名称】 新規細胞株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 血清および蛋白を含有しない培地（以下、無血清無蛋白培地という。）で2ヶ月以上増殖継代できる新規チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO細胞）のセルライン。

【請求項2】 無血清無蛋白培地に2ヶ月以上増殖継代できかつグルタミン非要求性を有する新規CHO細胞。

【請求項3】 無血清無蛋白培地が完全蒸気滅菌された培地である請求項（2）記載の新規CHO細胞。

【発明の詳細な説明】

産業上の利用分野

本発明は無血清無蛋白培地で培養できる新規チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO細胞）のセルライン、無血清無蛋白培地に2ヶ月以上増殖継代できかつグルタミン非要求性を有する新規CHO細胞に関する。

本発明で得られる細胞は有用蛋白質をコードする遺伝子を導入する宿主細胞として利用できる。

従来の技術

動物細胞の大量培養はウィルス、ワクチンの製造さらには白血球やハイブリドーマからインターフェロンやモノクローナル抗体を生産するために利用されている。また、近年では遺伝子組換え技術の進展に伴い、生体中に存在する生理活性物質の天然型として蛋白質を生産することから、動物細胞を宿主とした有用蛋白質の生産が注目され、大量培養技術の重要性が再認識されてきている。

動物細胞の大量培養による有用物質生産の問題点の一つとして、動物細胞の生育には基礎培地に血清を添加しなければならないことがあげられる。血清は高価であるばかりか、多種多様な蛋白質を含むため、目的蛋白質の

精製を複雑にする。またロット毎に品質が異なり、細胞増殖への影響も大きい。そこで無血清培地さらには無蛋白培地において増殖可能な細胞の開発が望まれている。

無血清培地を用いる方法としては、インスリン、トランスフェリン、セレンを含有する無血清培地でCHO細胞を培養する方法 [イン ビトロ セルラー アンド デベロップメンタルバイオロジー (in vitro Cellular & Developmental Biology)、21巻、10号、588頁、1985年]、インスリン、ヒドロコルチゾン、トランスフェリン、上皮細胞成長因子、線維芽細胞成長因子を含有する無血清培地でHela栽培を培養する方法 [プロシーディング オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) U.S.A.、75巻、2号、901頁、1978年]、インスリン、トランスフェリン、線維芽細胞成長因子、フィブロネクチン、オレイン酸を含有する無血清培地でBHK細胞を培養する方法 [ジャーナル オブ セルラー フィジオロジー (Journal of Cellular Physiology) 114巻、215頁、1983年] が知られている。また無血清培地で生育可能な細胞としては、モノクローナル抗体生産マウスハイブリドーマ (特開昭58-63385号)、インターフェロン生産ヒトパーキット腫瘍由来ナマルバ細胞の馴化細胞 (特開昭60-6190)、蛋白成長因子としてインスリンのみを添加した培地で生育するCHO細胞の馴化細胞 (特開昭63-192381) などが知られている。

成長因子の組合せにより種々の細胞の無血清培養が可能となってきたが、成長因子の中には高価なものもある。また大量培養による医薬品製造の観点から、成長因子の中に微量でも異種蛋白が混入していることは好ましくなく、使用する成長因子は非常に高純度であることが要求される。

そこで無血清培地で増殖できかつ、無蛋白培地で増殖可能な細胞が求められている。既に報告されている無血清馴化細胞を無蛋白培地で培養することは困難で、細胞の増殖が停止したり細胞生存率が著しく低下したりするため、物質の生産効率が良くない。

無蛋白培地で増殖する細胞株としては勝田らによって馴化された種々のP3株 [メソッズ イン セル バイオロジー (Methods in Cell Biology)、6巻、1973年] がある。しかしいずれもCHO細胞ではなく、しかもグルタミン要求性株である。

さらに、これらの細胞を培養する際には、培地成分の少なくとも一つの成分の滅菌にフィルターを用いており、微生物やウイルスなどの混入を厳密には否定されない。これらの微生物やウイルスなどの混入を防ぐためには、滅菌手段として加熱蒸気滅菌を用いることが必要であるが、蛋白成分あるいは栄養源のグルタミンなどが含まれていると加熱蒸気滅菌によって熱変性や分解をおこしてしまうので加熱蒸気処理を施すことはできない。グルタミン非要求性細胞としては、無蛋白かつグル

タミン不含培地中で増殖する正常ラット肝細胞由来細胞 [ドクキョー・ジャーナル・メディカル・サイエンス (Dokkyo J. Med. Sci.)、9巻、97-105頁、1982年]、蛋白質としてインスリン、トランスフェリンを必要とするがグルタミン不含培地で増殖するナマルバ細胞 [サイトテクノロジー (Cytotechnology)、1巻、151-158頁、1988年]、血清存在下でグルタミン非要求性にしたBHK21細胞アフリカミドリザルの細胞 [モダン・アプローチ・トゥー・アニマル・セル・テクノロジー (Modern Approaches to Animal cell technology)]、完全蒸気滅菌培地 (無蛋白、無グルタミン培地) 中で生育するK562細胞 [第5回次世代産業基盤技術シンポジウム予稿集、129-141頁、1987年] が知られている。

しかし、CHO細胞の亜株で、無血清無蛋白培地に生育し、さらにグルタミン不含培地でも生育できるという報告は知られていない。

#### 発明が解決しようとする課題

本発明の目的は、無血清無蛋白培地で2ヶ月以上増殖継代できる新規CHO細胞のセルライン、無血清無蛋白培地に2ヶ月以上増殖継代できかつグルタミン非要求性を有する新規CHO細胞を提供することにある。

#### 課題を解決するための手段

本発明によれば、無血清無蛋白培地で2ヶ月以上増殖継代できる新規CHO細胞のセルライン、無血清無蛋白培地に2ヶ月以上増殖継代できかつグルタミン非要求性を有する新規CHO細胞を提供することができる。

以下に本発明を詳細に説明する。

#### 1) 馴化の方法

馴化するための親株としては、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (Chinese hamster ovary cell: CHO細胞) 由来の細胞で無血清培地に増殖継代困難な細胞であれば、いずれの細胞でも用いることができる。好適な例としては、CHO-K1株 (ATCC CCL61) の亜株であるCHO細胞由来のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株CHO細胞d<sup>-</sup>DXB11株 [プロシーディング オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、77巻、4216-4220頁、1980年、ディー・エヌ・ユー (DNY) 3巻、297-308頁、1984年] があげられる。

CHO細胞は本来附着性細胞であるが、馴化させるには浮遊培養法を利用するのが好ましい。

浮遊培養において、細胞播種濃度は $0.5 \sim 8 \times 10^5$ 個/ml程度が好ましく、培養中この濃度を維持することが好ましい。また培地のpHが6.5以下にならないように、培地中の栄養源が枯渇しないように、定期的に培地を交換する必要がある。培地を交換する時点で細胞数が著しく低下している場合は、遠心分離や上清除去により濃縮し、逆に細胞数が向上している場合は希釈して細胞数を調整する。とくに馴化開始初期は細胞数の著しい低下を伴う場合がある。馴化期間は2ヶ月以上を要する。

CHO細胞d<sup>-</sup>DXB11株を例に、具体的な馴化方法を示す。

#### 1-1) 無血清培地への馴化方法

CHO細胞d<sub>1</sub>DXB11株を種細胞とし、附着状態ではほぼ接触阻止の起こる細胞数 ( $4 \times 10^5$ 個/ml) を、血清の代わりに血清代替物を添加した基礎培地 (40ml) に播種する。これを37℃で2~4日間培養する。その後浮遊状態で生育している細胞を1500rpmで5分間遠心分離し、新鮮基礎培地 (40ml) に再懸濁する。

このような操作を繰返すことにより、馴化株の生育が安定し生存率が向上する。馴化株の生存率が、親株を通常生育可能な培地で培養したときの生存率に近づくまでこの馴化操作を2ヶ月以上繰返し続ける。

基礎培地としては、動物細胞培養に用いられる一般的な培地を使用することができる。たとえばRPMI-1640、MEM、ダルベッコMEM、ハムF12、ハムF10、DM160、DM170 (極東製薬社製)、ダルベッコMEMおよびハムF12の1:1混合培地、RPMI-1640、ダルベッコMEMおよびハムF12の2:1:1混合培地などをあげることができる。

血清代替物として、トランスフェリン0.1~100μg/ml、好ましくは1~10μg/ml、インスリン0.1~100μg/ml、好ましくは1~10μg/ml、葉酸0.1~100μg/ml、好ましくは1~10μg/ml、亜セレン酸0.1~100×10<sup>-8</sup>M、好ましくは1~10×10<sup>-8</sup>M、ベポールB-188 (東邦千葉化学工業社製) 0.001~10%、好ましくは0.01~1%、ジメチル-αまたはβ-シクロデキストリン (東進ケミカル社製) 1μg~10mg/ml、好ましくは10~100μg/ml、ポリエチレングリコール20000 0.01~10%、好ましくは0.01~0.1%を組み合わせて用いる。

さらに添加物として、ヘパース緩衝液1~300mM、好ましくは5~25mM、グルタミン0.5~10mM、好ましくは1~5mM、硫酸第一鉄0.1~100μM、好ましくは5~50μM、MEM用非必須アミノ酸混合液0.1~25ml/100ml、好ましくは1~10ml/100mlを組み合わせて用いる。

このようにして無血清培地で生育可能なCHO細胞を得ることができる。得られた細胞をCHO細胞KJM-1株と命名する。

CHO細胞KJM-1株は接着非依存性を有し、無血清培地に浮遊状態で生育可能である。

#### 1-2) 無血清無蛋白培地への馴化方法

先に得られた無血清馴化CHO細胞KJM-1株を種細胞とし、 $4 \times 10^5$ 個/ml程度の細胞密度で、1-1) で使用した無血清培地からトランスフェリンおよびインスリンを除いた組成からなる無血清無蛋白培地 (40ml) に播種する。これを37℃で2~4日間培養する。その後浮遊状態で生育している細胞を1500rpmで5分間遠心分離し、上記の新鮮培地 (40ml) に再懸濁する。

このような操作を繰返すことにより、馴化株の生育が安定し生存率が向上する。馴化株の生存率が親株を通常生育可能な培地で培養したときの生存率に近づくまでこの馴化操作を2ヶ月以上繰返し続ける。

基礎培地、血清代替物およびその他の添加物はトラン

スフェリンおよびインスリンを除き、前記したものと同じものを用いることができる。

このようにして無血清無蛋白培地で2ヶ月以上生育可能なCHO細胞を得ることができる。得られた細胞をCHO細胞KJM-1PF株と命名する。

#### 2) グルタミン非要求性の付与

得られた無血清無蛋白馴化CHO細胞KJM-1PF株を、1-2) で使用した無血清無蛋白培地組成のグルタミンの代わりに過剰のグルタミン酸を添加した培地で培養することにより、CHO細胞KJM-1PF株にグルタミン非要求性を付与することができる。

過剰のグルタミン酸とは、一般的な培地に含有されているグルタミン酸含量の10~30倍程度であり、とくに20倍程度を培地に含有させるのが好ましい。

実施例3においては、グルタミンの代わりにグルタミンと同当量のグルタミン酸 (一般的に培地に含有されているグルタミン酸の20倍) を含有させた。

このようにして無血清無蛋白培地で2ヶ月以上生育可能でかつグルタミン非要求性を有するCHO細胞を得ることができる。得られた細胞をCHO細胞KJT-1株と命名する。

CHO細胞KJT-1株は、ブダペスト条約に基づき平成2年2月27日付で工業技術院微生物工業技術研究所に微工研条寄第2776号 (FERM BP-2776) として寄託されている。

CHO細胞KJT-1株の完全蒸気滅菌培地での生育及びグルタミン非要求性の確認については、直線的な証明方法として培養液中のグルタミンをアミノ酸自動分析機JLC-200A (日本電子社製) によって分析する方法がある。あらかじめ含まれていない成分であるグルタミンを培養上清中に検出することもあるが、CHO細胞KJT-1株を培養して得られた培養液を分析した結果、グルタミンの含有は確認されなかった。間接的な証明方法としては、CHO細胞KJT-1株の増殖曲線とグルタミン合成酵素の誘導によって証明する方法がある。

これらの結果により、蒸気滅菌した培地にはグルタミンがまったく含有されず、CHO細胞KJT-1株がグルタミンをまったく含有しない培地でも生育可能であることが証明される。

以下に本発明の実施例および参考例を示す。

#### 実施例1

##### 無血清培地馴化株の育成

ハムF12を基礎培地として、トランスフェリン10μg/ml、インスリン10μg/ml、葉酸10μg/ml、亜セレン酸1.25×10<sup>-8</sup>M、ベポールB-188 0.1%、ヘパース緩衝液7.5mM、グルタミン2mM、硫酸第一鉄10μM、MEM用非必須アミノ酸混合液10ml/100mlおよび重曹0.15%を加えた無血清培地 (以下、培地aという。) 40mlを75cm<sup>2</sup>の培養フラスコへ入れ、そこへCHO細胞d<sub>1</sub>DXB11株 (血清依存性) を $4 \times 10^5$ 個/ml程度の細胞密度で播種した。

37℃で3日間静置培養した後、浮遊状態で生育してくる細胞を1500rpmで5分間遠心分離して集め、前記と同じ組成からなる新鮮無血清培地40mlに再懸濁した。

細胞は継代するにしたがって生存率が低下した。培養を開始してから7日目には生存率は7%まで低下したが、そのまま継代培養を繰り返すことにより細胞の生存率が向上した。培養を開始してから2ヶ月後には生存率80%以上に回復し、細胞数も $1 \times 10^6$ 個/ml程度まで増殖可能となった。以後、培養を開始してから17ヶ月以上安定した増殖を示している。

このようにして無血清培地馴化株であるCHO細胞KJM-1株が得られた。

#### 実施例2

無血清無蛋白培地馴化株の育成

ハムF12を基礎培地とし、亜セレン酸 $1.25 \times 10^{-6}$ M、ペボールB-188 0.1%、ヘブス緩衝液7.5mM、グルタミン2mM、硫酸第一鉄 $10 \mu$ M、MEM用非必須アミノ酸混合液10ml/100mlおよび重曹0.15%を添加した無血清無蛋白培地（以下、培地bという。）40mlを75cm<sup>2</sup>の培養フラスコへ入れ、そこへCHO細胞KJM-1株を $4 \times 10^6$ 個/ml程度の細胞密度で播種した。37℃で3日間静置培養した後、浮遊状態で生育している細胞を1500rpmで5分間遠心分離して集め、前記と同じ組成からなる新鮮無血清無蛋白培地40mlに再懸濁した。

細胞は継代するにしたがって生存率が低下した。培養を開始してから7日目には生存率は20%まで低下したが、そのまま継代培養を繰り返すことにより細胞の生存率が向上した。培養を開始してから2ヶ月後には、生存率80%以上に回復し、細胞数も $1 \times 10^6$ 個/ml程度まで増殖可能となった。

このようにして無血清無蛋白培地馴化株であるCHO細胞KJM-1PF株が得られた。

#### 実施例3

グルタミン非要求性の付与

実施例2で用いた無血清無蛋白培地組成のグルタミン2mMの代わりにグルタミン酸4mMを加えた培地（40ml）に、実施例2で得られたCHO細胞KJM-1PF株を播種し、37℃で3日間培養した。

このようにして無血清無蛋白培地に2ヶ月以上増殖継代できかつグルタミン非要求性を有するCHO細胞KJT-1株が得られた。

#### 参考例1

グルタミン非要求性の付与の確認

ハムF12を基礎培地とし、亜セレン酸 $1.25 \times 10^{-6}$ M、ペボールB-188 0.1%、ヘブス緩衝液7.5mM、硫酸第一鉄 $10 \mu$ M、グルタミン酸4mM、MEM用非必須アミノ酸混合液10ml/100mlを添加した無血清無蛋白培地40mlを蒸気滅菌し、さらに使用時に別途蒸気滅菌した重曹を0.15%になるように添加した培地（以下培地cという。）で、CHO細胞KJT-1株37℃で培養した。

その結果を第3図に示す。

#### 参考例2

細胞内グルタミン合成酵素活性の比較

培地cでCHO細胞d<sup>-</sup>DXB11株およびCHO細胞KJT-1株をそれぞれ37℃で4日間培養した。

培地bを()過滅菌した培地でCHO細胞d<sup>-</sup>DXB11株およびCHO細胞KJM-1PF株をそれぞれ37℃で4日間培養した。

培養後それぞれの細胞内のグルタミン合成酵素活性を比較した。結果を第1表に示す。

第 1 表

試験細胞株 (使用培地)	活性 ( $\mu$ mole/ $10^6$ cells/day)
CHO細胞 d <sup>-</sup> DXB11株 (培地b)	0.054
CHO細胞 d <sup>-</sup> DXB11株 (培地c)	0.188
CHO細胞 KJM-1PF株 (培地b)	0.062
CHO細胞 KJT-1株 (培地c)	0.080

#### 発明の効果

本発明によれば、無血清無蛋白培地で2ヶ月以上増殖継代できる新規CHO細胞のセルラインおよび無血清無蛋白培地に2ヶ月以上増殖継代できかつグルタミン非要求性を有する新規CHO細胞を提供することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

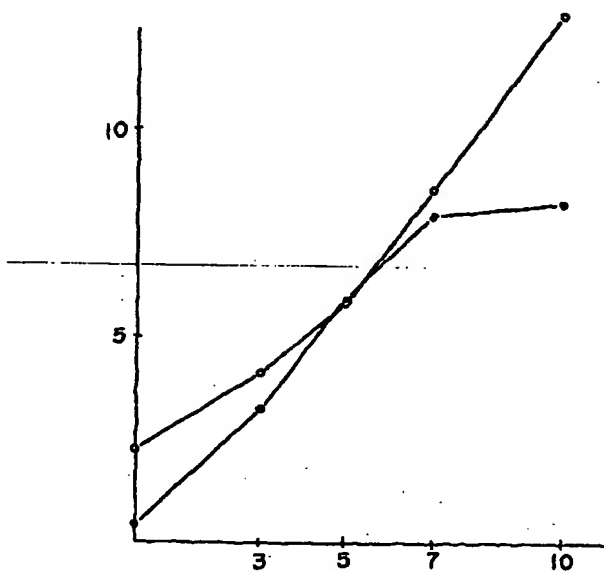
第1図は、CHO細胞KJM-1株を37℃下、培地aで培養し

たときの細胞増殖曲線およびCHO細胞d<sup>-</sup>DXB11株を37℃下、培地a組成中トランスフェリンおよびインスリンの代わりに5%牛胎児血清を添加した培地で培養したときの増殖曲線を示す。図中、白丸実線はCHO細胞KJM-1株、黒丸実線はCHO細胞d<sup>-</sup>DXB11株の増殖曲線である。第2図は、CHO細胞KJM-1PF株を37℃下、培地bで培養したときの増殖曲線を示す。

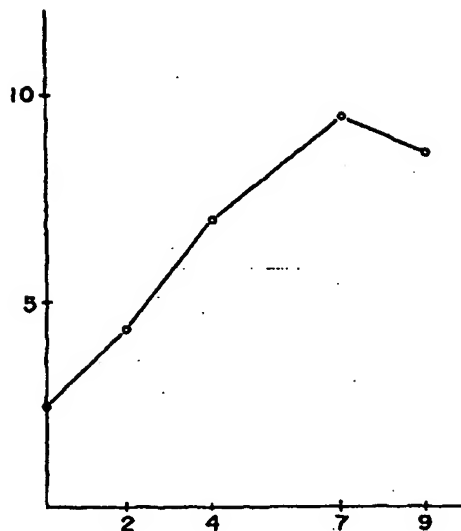
第3図は、CHO細胞KJT-1株を37℃下、培地cで培養したときの増殖曲線を示す。

いずれの図も縦軸は生細胞数 ( $1 \times 10^5$  cells/ml)、横軸は培養日数を表す。

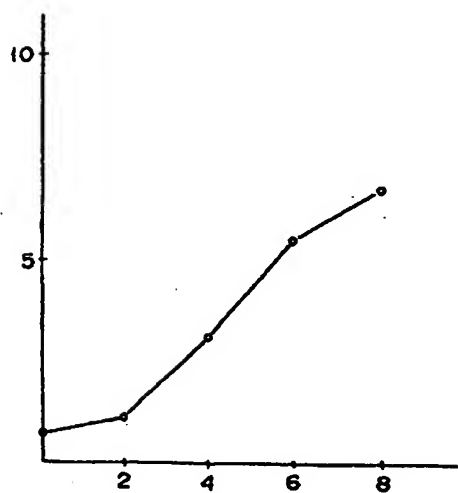
【第1図】



【第2図】



【第3図】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

(C12N 5/10

C12R 1:91)

識別記号

F I